

棉铃虫幼虫感染棉铃虫微孢子虫后的组织病理变化

冉红凡¹, 冯书亮^{2*}, 潘文亮², 范秀华²

(1. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002; 2. 河北省农林科学院植物保护研究所, 河北保定 071000)

摘要: 1997年田间调查时发现一种寄生于棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Hübner) 的微孢子虫 *Nosema* sp., 它对棉铃虫有较强的致病力并可经卵垂直传播。利用透射电镜对棉铃虫幼虫感染该微孢子虫后的组织病理变化进行了初步观察。结果表明: 该微孢子虫可侵染棉铃虫的中肠、马氏管、脂肪体、神经等组织; 侵染后可导致寄主中肠的微绒毛脱落, 线粒体内脊排列方向发生变化, 线粒体整体发生变形并最终瓦解; 内质网发生断裂; 细胞核体积变小并变形, 但该微孢子虫并不入侵细胞核; 马氏管膨大, 边缘向外突出隆起; 神经细胞的细胞核变成长条形, 细胞界线模糊; 在神经细胞内也发现了微孢子虫孢子, 证明该微孢子虫也入侵寄主神经细胞。

关键词: 棉铃虫; 微孢子虫; 组织病理学; 超微结构

中图分类号: S435.622.3 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296 (2003) 01-0118-04

Observations on histopathology of tissue infected by *Nosema* sp. (Microsporida) in *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae

RAN Hong-Fan¹, FENG Shu-Liang^{2*}, PAN Wen-Liang², FAN Xiu-Hua² (1. College of Life Science, Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China; 2. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forest Sciences, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: A previously unknown microsporidian pathogen *Nosema* sp. in *Helicoverpa armigera* (Hübner) is described. It invaded *H. armigera* larvae and could be transmitted vertically to their offspring. This study investigates ultrastructural changes of infected host cells using electron microscopy. The results indicate that the pathogen occurs in the midgut, fat bodies, malpighian tubules and nerve cells of the host. After invading the host, it causes the micro-villi of the midgut to fall off, the nucleus to become smaller and the shape of the nucleus to change. The malpighian tubules become swollen and the nucleus of nerve cells becomes elongated and their boundaries indistinct. The mitochondria become smaller and the cristae become aligned parallel or at an angle to the long axis of the mitochondria. The endoplasmic reticulum is disordered, however, the pathogen did not invade the nucleus.

Key words: *Helicoverpa armigera*; microsporidian; histopathology; ultrastructure

微孢子虫是专性细胞内寄生的原生动植物, 主要寄生于昆虫细胞内, 能够引起昆虫种群内的流行病, 是自然界中制约昆虫种群密度的重要因子之一。它具有对人畜无毒无害, 不污染环境, 不杀伤天敌等优点, 在农业害虫的防治中, 发挥着重要作用。作者于1997年田间调查时在河北邯郸和保定等地发现一种寄生于棉铃虫的微孢子虫, 它属于 *Nosema* 属 (范秀华等, 2000), 对棉铃虫有很强的致病力, 2龄幼虫感染该微孢子虫7天, 死亡率可达100%, 3~4龄幼虫感染后的死亡率也可达60%。关于感染微孢子虫后昆虫的组织病理变化,

国外学者已经作过一些研究 (Lee and Anstee, 1992)。因微孢子虫种类不同, 其侵染部位及致病机理会有所差异。为明确该微孢子虫对棉铃虫的致病机理, 本文作者对棉铃虫感染该微孢子虫后的病理变化进行了初步观察。

1 材料和方法

1.1 棉铃虫微孢子虫悬液制备

将染病幼虫研碎, 纱布过滤, 离心后用酒石酸钠密度梯度离心法提纯孢子。

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (301465)

作者简介: 冉红凡, 男, 1976年7月生, 河北满城人, 硕士生, 研究方向为杀虫微生物, E-mail: ranhongfan@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: Fshliang@heinfo.net

收稿日期 Received: 2001-11-12; 接受日期 Accepted: 2002-06-05

1.2 棉铃虫虫源

由本实验室在 26℃, 光周期 16:8 (L:D), 一定湿度条件下人工饲养。

1.3 棉铃虫感染方法

将调制好的微孢子虫悬液(浓度为 10^8 孢子/mL)涂敷于饲料上, 接入健康的棉铃虫 3 龄幼虫, 然后置于 26℃ 的人工气候箱内感染饲养。

1.4 透射电镜样品制备

定期取感病棉铃虫幼虫的组织 and 对照幼虫的组织, 2.5% 戊二醛前固定, 1% 锇酸后固定, 梯度乙醇脱水, Epon 812 包埋, Ultr-cut-E 超薄切片机切片, 醋酸铀-柠檬酸铅双染色, 日本电子 SX-100 透射电镜观察、拍片。

2 结果与分析

2.1 感染部位与症状

棉铃虫幼虫感染初期, 微孢子虫主要侵染寄主中肠、马氏管和脂肪体。感染初期, 幼虫没有明显的症状, 4~5 天后幼虫取食减少, 行动缓慢, 逐渐不食不动, 最终死亡。解剖镜检可以看到, 幼虫中肠颜色较正常的黯淡, 外被一层粘液; 脂肪体由黄白色变为乳白色, 充满寄主体腔; 马氏管膨大, 颜色变深。感病幼虫的神经索从肉眼看来没什么变化, 但电镜下也观察到微孢子虫, 证明感染后期微孢子虫也侵染寄主神经细胞, 这可能是该微孢子虫对棉铃虫幼虫致病力较强的原因之一。

2.2 感病组织超微结构的变化

2.2.1 马氏管: 正常马氏管边缘呈一条直线(图版 I: 1), 管径较小(图版 I: 3)。而受严重感染的马氏管内含微孢子虫孢子, 边缘向外突出隆起(图版 I: 2), 管径也较大(图版 I: 4), 正在逐步瓦解。

2.2.2 中肠: 正常中肠微绒毛排列整齐, 不脱落(图版 I: 5); 感染微孢子虫后, 中肠微绒毛脱落严重(图版 I: 6)。正常细胞的细胞核呈圆球形, 饱满(图版 I: 7); 而感染微孢子虫细胞的细胞核体积变小, 两端变尖(图版 I: 8), 但细胞核内未发现微孢子虫。

2.2.3 线粒体: 正常线粒体应为椭圆形, 内脊与纵轴垂直; 随着微孢子虫感染, 线粒体也发生变化, 轻微感染时内脊仍与纵轴垂直(图版 I: 9); 感染严重时内脊与纵轴平行, 线粒体体积变小, 形状也变得多种多样(图版 I: 10), 最终导致线粒

体解体。

2.2.4 神经细胞: 正常的神经细胞, 细胞核呈圆球形, 饱满, 细胞边界清晰(图版 I: 11); 严重感染微孢子虫的细胞核则呈长条形, 细胞边界模糊(图版 I: 12)。另外在神经细胞中发现了微孢子虫孢子, 证明该微孢子虫能侵染寄主神经细胞(图版 I: 13)。

3 讨论

该微孢子虫进入寄主细胞后, 仅寄生于细胞质中, 并不入侵细胞核, 这与多数微孢子虫对寄主的影响类型一致(Weissenberg, 1976)。微孢子虫本身不具有线粒体, 其能量来源完全依赖寄主细胞的供给。孢子与寄主细胞的能量竞争导致寄主细胞的呼吸作用和能量代谢加强, ATP 含量增高。而 ATP 含量的增多会对线粒体产生抑制, 这样最终导致线粒体的解体。另外, 线粒体是易变的细胞器, 易受各种因素影响而变形(Wang and Moeller, 1971), 因此线粒体形状的变化也可能是受其他因素的影响, 如孢子在增殖中可能产生某种物质引起线粒体变形, 还有孢子本身的机械挤压作用也可能导致线粒体变形, 所以线粒体变形和瓦解可能是多种因素共同作用的结果。

陈广文和陈曲侯(1999)研究甜菜夜蛾微孢子虫时, 曾观察到寄主细胞核的膨大, 但在本实验中只观察到细胞核变小, 可能是由于微孢子虫的入侵, 细胞内各细胞器尤其是线粒体的破坏, 导致细胞核能量来源的缺乏, 因此其体积变小, 逐渐变成长条状和絮状。

本实验还观察到微孢子虫寄生于神经细胞。有关微孢子虫侵染寄主神经的研究, 日本学者曾有这方面的报道, 他们发现微孢子虫 *Nosema mesnili* 能侵染斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫的神经节, 但仅见于神经节外层(Yoshihiko, 1989)。而在本实验中发现该微孢子虫能入侵棉铃虫幼虫神经细胞, 它对神经细胞的寄生可能会引起细胞内 ATP 含量的增高, 不仅抑制神经细胞内线粒体等细胞器的活性, 使细胞的整体活性降低, 而且还影响细胞内钠钾 ATP 酶的活性, 使胞内外的正负离子浓度出现不平衡, 从而影响神经传导等活动, 这也可能是该微孢子虫对棉铃虫致病性强的主要原因之一。

致谢 本文完成过程中, 得到了河北大学生命科学

学院郭明申老师、1999 级研究生于春霞及 1997 级学生甄威和陈红波等人的帮助，在此一并致谢。

参 考 文 献 (References)

Chen G W, Chen Q H, 1999. Studies on *Nosema* sp. (Microsporida) from beet armyworm, *Laphygma exigua* (Hübner): III. Ultrastructure and pathogenic mechanism. *Acta Zool. Sin.*, 45 (2): 121–128. [陈广文, 陈曲侯, 1999. 甜菜夜蛾微孢子虫研究. III 超微结构和致病机理. 动物学报, 45 (2): 121–128]

Fan X H, Feng S L, Wang R Y, Hu M J, 2000. Primary study on a microsporidian from *Helicoverpa armigera*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 27 (4): 377. [范秀华, 冯书亮, 王容燕, 胡明峻, 2000. 棉铃虫微孢子虫的初步观察. 植物保护学报, 27 (4): 377]

Lee M J, Anstee J H, 1992. An ultrastructural study on stages in the life cycle of a microsporidian parasite (Microsporida: Nosematidae) in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Inverteb. Pathol.*, 59 (3): 271–279.

Wang D I, Moeller F E, 1971. Ultrastructural changes in the hypopharyngeal glands of worker honeybees infected by *Nosema apis*. *J. Inverteb. Pathol.*, 17: 308–320.

Weissenberg R, 1976. Host-parasite relations of microsporidia at the cellular level. In: Bulla L A Jr, Cheng T C eds. *Comparative Pathobiology* (Vol. 1). New York: Plenum Press. 203–237.

Yoshihiko A B E, 1989. Acute paralysis of larvae of the common cutworm, *Spodoptera litura*, infected with a microsporidium *Nosema mesnili* (Microsporida: Nosematidae). *Jap. J. Appl. Entomol. Zool.*, 33 (4): 247–249.

图 版 说 明 (Explanation of Plate)

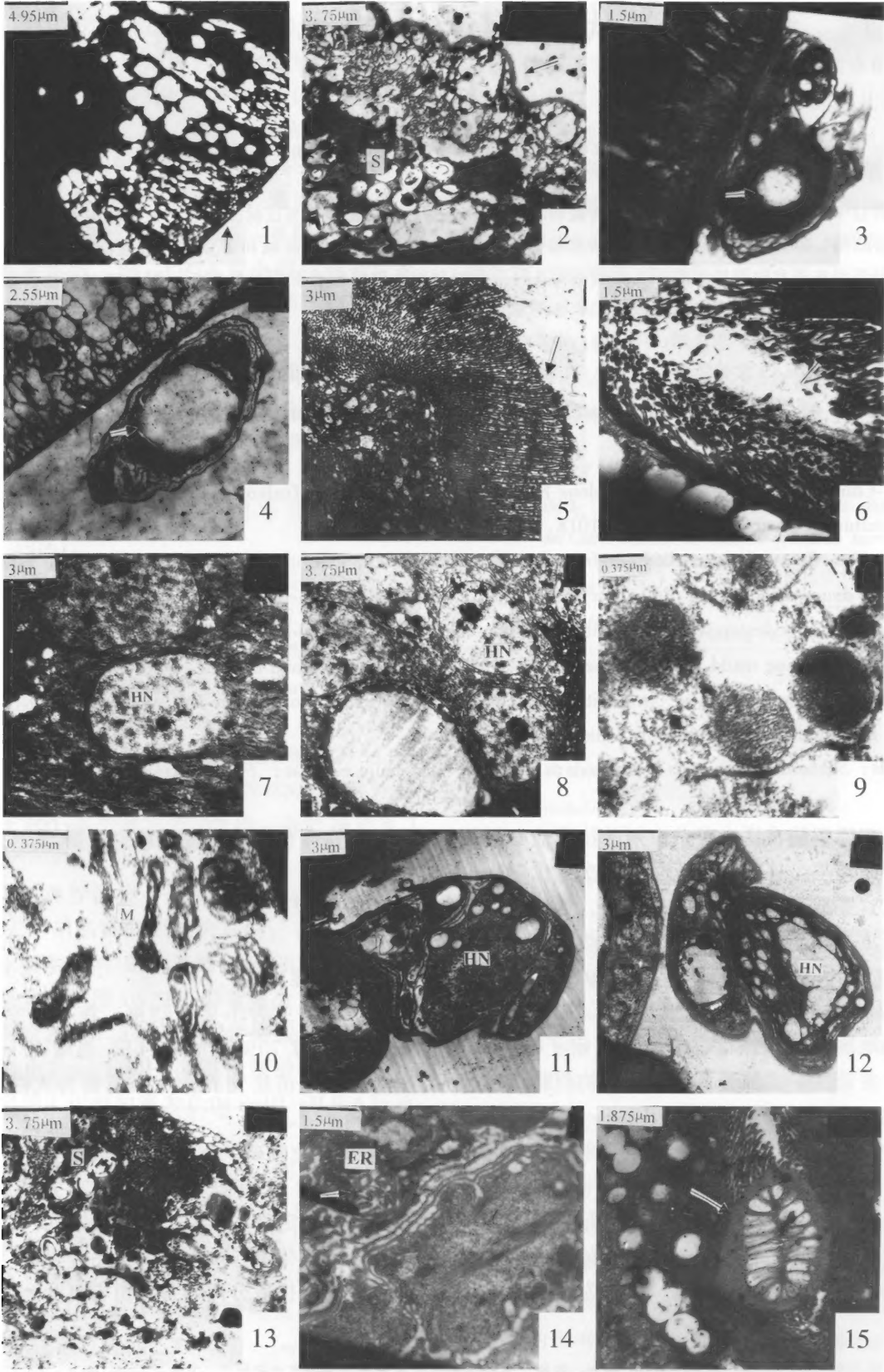
图版 I Plate I

1. 正常马氏管边缘呈一条直线 (uninfected malpighian tubule showing straight edges) 3 000 ×
 2. 严重感染 (192 h) 的马氏管, 内含微孢子虫孢子, 边缘向外突出隆起 (heavily infected malpighian tubule showing spores within and prominent external perimeter) 4 000 ×
 3. 正常马氏管, 管径较小 (normal malpighian tubule showing small diameter) 10 000 ×
 4. 严重感染 (192 h) 的马氏管, 管径较大 (heavily infected malpighian tubule showing large diameter) 6 000 ×
 5. 正常中肠微绒毛排列整齐 (uninfected midgut showing normal numbers of micro-villi) 5 000 ×
 6. 严重感染 (192 h) 的中肠, 微绒毛脱落严重 (heavily infected midgut showing heavily reduced micro-villi) 10 000 ×
 7. 正常中肠细胞的细胞核, 体积大, 饱满, (nucleus of normal midgut cell showing big size and equilibrium substance within) 5 000 ×
 8. 严重感染 (168 h) 的中肠内细胞核, 体积较小, 两端变尖 (nucleus of heavily infected midgut cell showing smaller size and narrowed end) 4 000 ×
 9. 线粒体轻微感染 (72 h), 逐渐由椭圆变圆, 内脊仍与纵轴垂直 (slightly infected mitochondria became round and the cristae are aligned perpendicular to the long axis) 40 000 ×
 10. 严重感染时 (192 h), 线粒体内脊与纵轴平行, 形状变化明显 (heavily infected mitochondria showing the cristae parallel to its long axis and deformed shape) 40 000 ×
 11. 正常的神经细胞, 可以看到细胞核圆形, 饱满, 细胞边界清晰 (normal nerve cells showing round nucleus and distinct boundary) 5 000 ×
 12. 严重感染 (192 h) 的神经细胞, 可以看到细胞核长条形, 絮状, 细胞边界模糊不清 (heavily infected nerve cells showing elongate nucleus and indistinct boundary) 5 000 ×
 13. 严重感染 (192 h) 的神经细胞, 示细胞内的孢子 (heavily infected nerve cells showing the spores of the microsporida within) 4 000 ×
 14. 感染 144 h 的中肠, 部分内质网遭到破坏 (144 hours after infection, a part of the endoplasmic reticulum was destroyed) 10 000 ×
 15. 感染 48 h 的中肠, 发现其中含有一个呈辐射状排列的物体 (midgut 48 hours after infection showing matter with radial arrangement) 8 000 ×
- S: 孢子 spore; HN: 寄主细胞核 host nucleus; M: 线粒体 mitochondria; ER: 内质网 endoplasmic reticulum

RAN Hong-Fan *et al.* : Observations on histopathology of the tissue infected by *Nosema* sp. (Microsporida)

in *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae

Plate I



图版说明见文后 (Explanation at the end of the text)